第9卷 第3期
1988年8月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICA RESEARCH

Vol.9,No.3
Aug.,1988

砂鼠利什曼原虫(*Leishmania gerbilli*)的亚显微结构

吴传芬 李靖炎
(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

砂鼠利什曼原虫(*Leishmania gerbilli*)存在于我国西北甘肃某地的砂土鼠或大砂鼠(*Rhombomys opimus*)体内,是中国特有的种类,王捷等60年代分离培养成功。对*L. gerbilli*的前鞭毛体的亚显微结构的观察表明:1.质膜下微管间距约为50nm,比别的利什曼原虫的宽;2.鞭毛基部极少观察到基板(basal plate);3.线粒体发达,从动基体所在部位伸向虫体各个部位,内有复杂的嵴结构;4.在通常情况下,*L. gerbilli*的动基体呈棒状,但当细胞膨胀后则无论在光镜或电镜下动基体均呈扁环结构;5.虫体后部有发达的复片层结构。这一结构由一系列的膜卷绕成,其意义不明。

关键词:动基体鞭毛虫,利什曼原虫,动基体,亚显微结构

在原生动物中间,动基体鞭毛虫(order Kinetoplastida)是一类特殊的生物。在这类鞭毛虫体内,唯一只有一个线粒体,其分枝延伸到细胞的各个部位。这个线粒体所含的染色质的量非常多,在线粒体内的一个区域(如锥虫*Trypnosoma*、利什曼原虫*Leishmania*)或几个区域(如波多虫*Bodo*)成为光学显微镜下明显可见的致密结构。这种结构自1898年被发现以来,先后有过许多不同的名称,后来大多称之为"动基体(Kinetoplast)",本文也沿用这个术语。

根据线粒体起源的内共生学说,线粒体起源于真核细胞祖先体内营胞内共生生活的一种真细菌。对于线粒体染色质体的研究有助于启发我们对原核生物染色质体的认识。关于动基体,研究得比较深入、比较清楚的是其DNA成份。对动基体的蛋白成份和动基体的构造则研究得很不够。我们在研究动基体碱性蛋白的同时,对*L. gerbilli*的亚显微结构作了较全面的观察,从中得到一个意外的有特殊意义的新发现,即:虽然*L. gerbilli*的动基体通常情况下也是和其它利什曼原虫的一样,在显微镜下呈棒状,在常规

本工作得到本所电镜室刘德胜,黄有先,谢庆春等同志的支持,特此致谢。
本文1987年10月28日收到,同年12月24日修回。

超薄切片上呈横条状，但细胞膨胀后，在显微镜和电镜下所观察到的动基体都是一个扁环结构（Li Jing-yan and Wu Chuan-fen, 1985）。这就提示我们：原核生物的染色质体在亚染色体水平上可能也是由一个染色质环构成的。

材料与方法

砂鼠利什曼原虫（*Leishmania gerbilli*）虫种由王捷等提供，培养也参照他们（1964）的方法。

培养基组成：N. N. N.培养基(Novy-McNeal-Nicolle medium）无菌去纤兔心血和Locke液三者的比例为1：1：1。先将N. N. N. 培养基与兔心血混匀，放置成斜面，待凝固后加入Locke液。

接种培养：接种前把培养基从冰箱中取出，置室温下0.5至1小时，然后接种。3ml培养基中接入3接种环，5ml的培养基中接种5环。在20°— 25°C恒温箱中培养。接种3天后观察其生长情况。如生长良好则虫体聚集成菊花状小团，与王捷等（1964）的观察结果相同。培养5天后做实验。

方 法

显微镜观察材料采用了铁矾—苏木精染色、Feulgen反应和碳酸氨银反应。

制片：取接种5至10天的培养物，离心（800g，10分钟）收集材料。Locke液洗二次，10%中性福尔马林固定并保存。涂片前先离心并用蒸馏水洗去福尔马林。

铁矾—苏木精染色：用5%铁矾水溶液媒染12小时，4%苏木精染液浸染24小时，2%铁矾溶液分色。

Feulgen反应：实验中发现经福尔马林固定的材料直接作Feulgen反应时，细胞核和动基体往往呈泡状。若先用Carnoy液浸泡半小时再作Feulgen反应，细胞核和动基体即不再呈泡状。

碳酸氨银反应（AS反应）：采用了Tramezzani等的方法（Tramezzani *et al.*, 1966）。但原程序不适用于利什曼原虫这样微小的材料。经过摸索，修改了银染后的洗涤时间，采用重蒸水洗涤5次，每次20秒，可得到满意结果。

电镜制样

常规制样：用2.5%戊二醛（pH 7.3），4°C固定2小时，牛血清蛋白凝固，2%锇酸后固定。环氧树脂812包埋，超薄切片经常规铀、铅盐双染。

1.将经由10%中性福尔马林固定并凝成团的材料切成小块，先作AS反应，再脱水、包埋、超薄切片，双染后观察。

2.取部分经中性福尔马林固定的材料，经锇酸固定后脱水、包埋、超薄切片，双染后观察。

结 果 与 讨 论

1.光学显微镜观察结果

*L.gerbilli*的前鞭毛体在N. N. N. 培养基—兔心血＋Locke 液双相培养基中生长时有两种体型：早期的前鞭毛体较短圆；成熟的前鞭毛体较细长。经中性福尔马林固定，作Feulgen反应、AS 反应后在光学显微镜下观察和测得的结果是：早期前鞭毛体个体长3—7μ，宽2—7μ。虫体的宽度与长度近似，但其前端（具鞭毛端）较尖突，后端钝圆，呈"梨"形（图版Ⅰ:1）；成熟的前鞭毛体个体长7—15μ，宽1—3μ。虫体前端有一条鞭毛。经铁矾—苏木精染色后测得鞭毛长12—18μ。这些与王捷等的报道基本相似。虫体内有一近乎圆形或椭圆形的细胞核。在细胞核的前方，紧邻鞭毛基部处有一着色深的横条，即*L. gerbilli*的动基体，作AS反应后，在光学显微镜下观察有棒状和扁环状两种形象。测量的结果动基体长0.5—1μ，宽0.2—0.5μ。

2.电镜观察结果

质膜及质膜下微管：在电镜下 *L. gerbilli* 的质膜亦呈单位膜结构，厚度为10—13nm。其外侧电子致密层较内侧电子致密层厚，常见有不定形物质附着在外表面（图版Ⅰ：2.）。Lewis认为这是动物细胞表面都有的多糖物质（Lewis, 1975）。在质膜下排列着一层走向与虫体长轴近于平行的微管（图版Ⅰ：3），这与其它动基体鞭毛虫的结构也很相似。Lewis（1975）在研究两种爬行动物利什曼原虫和一种哺乳动物利什曼原虫时观察到质膜下微管间彼此有电子致密的物质相连，微管与内质网间也有物质相连。对此，我们在*L. gerbilli*中则未见到。Garnharm 报道说哺乳动物利什曼原虫（热带利什曼原虫 *Leishmania tropica*）质膜下微管间距为35—40nm（Garnharm, 1971）；Lewis（1975）观察到哺乳动物利什曼原虫（*Leishmania m. mexicana*））的微管间的平均距离为26.5nm。我们所观察的 *L. gerbilli* 的微管间距则为50nm 左右。由此可见，微管间的距离是因种而异的。

鞭毛：*L. gerbilli*的鞭毛轴丝也是由"9＋2"的微管组成(图版Ⅰ:7, 8.)。鞭毛基部位于动基体前方靠近线粒体处(图版Ⅰ：4, 5)鞭毛与胞体之间有一鞭毛袋（flagellar pocket)，有时很小（图版Ⅰ：4），有时很大（图版Ⅰ：5）。从基部向前，在鞭毛轴丝的一侧出现了在横切面上呈半圆形的结构与轴丝伴行（图版Ⅰ：7）。鞭毛的体外段，在横切面上可见由三部份组成：①9＋2型的轴丝；②与轴丝伴行的结构；③外膜（图版Ⅰ：8）。

L. gerbilli 的鞭毛基部极少见到基板。在历时一年的观察中只偶尔两次看到两个成熟前鞭毛体鞭毛基部有基板（图版Ⅰ：6）。这似乎与其它利什曼原虫不同，原因尚不清楚。

细胞核：细胞核位于虫体后部，呈圆形或椭圆形。染色质沿核膜分布在细胞核周边，核中央见有唯一的一个巨大核仁（图版Ⅰ：1）。

线粒体：在动基体存在的部位，线粒体内腔宽阔，嵴丰富（图版Ⅰ：9，13）。线粒体从动基体存在处发出分枝沿身体侧面伸向后端（图版Ⅰ：12，13），伸到后端的部分内嵴十分复杂（图版Ⅰ：12，13，14）。

复片层结构：*L. gerbilli*的复片层结构（multilamellar structure）特别发达，位于体后端。在高倍放大下观察，复片层结构是由一系列膜平行绕成的同心圆或同心椭圆结构（图版Ⅰ：15，16）。在其它利什曼原虫尚未见到类似的报道。在 *L. gerbilli* 中未观察到内质网，这些复片层结构是否就是由内质网膜卷绕成的，还有待进一步观察。

动基体：动基体位于靠近鞭毛基部的线粒体腔内。经戊二醛和锇酸固定的材料中动基体在虫体的纵切面上呈横条状（图版Ⅰ：9，12，13）。仔细观察，动基体是由染色质丝构成的（图版Ⅰ：9）。经中性福尔马林固定的材料无论是作 AS 反应后作超薄切片或是不作 AS 反应而经锇酸固定后作超薄切片观察，都可明确见到动基体为扁环结构（图版Ⅰ：10，11）。

L. gerbilli 的动基体看来并不是一个棒状结构而是一个极扁的环状结构。由于环的内腔极为狭窄，环索彼此靠近，因此在戊二醛—锇酸固定的材料中，动基体呈棒状。而用中性福尔马林固定时，线粒体膨胀，动基体扁环也随之被拉开，环的内腔变大，显出明显的"环"状。环索的宽度与戊二醛—锇酸固定的材料中的动基体的宽度相同（0.06μ左右）。AS 反应后的动基体在光学显微镜下观察，其宽度为 0.2—0.5μ，电镜下观察到的动基体的宽度则仅有0.06μ 左右。这样大的差别固然与电镜固定和包埋过程中材料的收缩有关，但看来也与福尔马林固定和 AS 反应中材料的膨胀有关。可以认为在光学显微镜下所见到的其实是整个已经膨胀了的动基体扁环，而 0.2—0.5μ 所代表的乃是此时整个环的宽度。AS 反应后在光学显微镜下见到的动基体不着色的中空处可能就是已经膨胀了的动基体环中的腔。

波多虫的动基体在超薄切片上的形象与涡鞭毛虫的染色体的高度一致，有一系列的横带（Brugerolle and Mignot，1979），按照Oakley 与 Dodge的重组连续超薄切片研究，涡鞭毛虫类的染色体是由一个染色质环螺旋绞纽而成的结构（Oakley and Dodge，1979）。由此可以设想波多虫的动基体应该也是这样的结构。在一般情况下，锥虫的动基体在超薄切片上并不呈现出涡鞭毛虫染色体的横带样结构，而与利什曼原虫动基体一样呈棒状。但已知在溴乙锭作用下，其动基体也会出现横带结构（Delain et Riou，1969），这可以解释为：在通常情况下锥虫动基体也是一个极扁的环，而在溴乙锭的作用下，这个环方才绞纽起来的缘故。

染色质体的环状结构应该并非*L. gerbilli* 的动基体所特有。根据线粒体起源的内共生学说，线粒体起源于真核细胞祖先体内营胞内共生生活的古代的某种真细菌。线粒体的染色质体应该具有原核生物染色质体的某些基本特征。*L. gerbilli* 动基体环状结构的发现启发我们推测原核生物的染色质体也是由染色质环扭曲或不扭曲构成。这个推测后来在大豆根瘤菌（*Rhizobium japonicum*）类菌体染色质体中得到了证实（吴传芬、李靖炎，1986）。

图版Ⅰ、Ⅱ说明

图1，*L. gerbilli*的前鞭毛体。N，细胞核；NO，核仁；K，动基体；V，空泡；F，鞭毛。×20,000

图2，*L. gerbilli*纵切片的一部份，示质膜（PM）。×150,000

图3，*L. gerbilli*横切片的一部份，示质膜下微管（MT）。×100,000

图4，*L. gerbilli*前端纵切片，示鞭毛结构。FB，鞭毛基部；PT，鞭毛外周微管；FP，鞭毛袋。鞭毛基部无基板。×80,000

图5，*L. gerbilli*前端纵切片。F，鞭毛；FP，鞭毛袋。鞭毛基部无基板。×100,000

图6，*L. gerbilli*前端纵切片。F，鞭毛；↑，示基板。×40,000

图7，*L. gerbilli*前端切片，示鞭毛。△，示与轴丝伴行的结构。×50,000

图8，*L. gerbilli*鞭毛体外段横切片。FA，鞭毛轴丝；△，示与轴丝伴行的结构；▲，示鞭毛外膜。×80,000

图9，*L. gerbilli*前端切片示动基体。MIT，线粒体；K，动基体，由染色质丝构成。×120,000

图10，*L. gerbilli*动基体。碳酸氨银反应，切片经铀、铅双染。由于洗涤过度，银粒稀少，但动基体扁环结构明显可见。▲，示动基体环的内腔；KC，动基体扁环。×70,000

图11，*L. gerbilli*动基体。中性福尔马林固定，锇酸后固定，切片经铀、铅双染。KC，动基体扁环。×60,000

图12，*L. gerbilli*纵切片的一部份。MIT，线粒体，从动基体处伸向体后部，内有复杂的嵴结构。×60,000

图13，*L. gerbilli*体后部纵切片，示发达的线粒体。可见其宽阔的内腔和复杂的内嵴。×60,000

图14，*L. gerbilli*体后端切片，示线粒体复杂的内嵴。×60,000

图15，16，*L. gerbilli*体后端切片，示发达的复片层结构（MS）。图15，×50,000；图16，×70,000

参 考 文 献

王捷 瞿端琦 管立人 1964 寄生虫学报 1（2），105—116。

吴传芬 李靖炎 1986 中国细胞生物学会第三次会议（1986年10月30日至11月4日，成都）论文摘要汇编，p.1.

Brugerolle, *et* J.-P. Mignot, 1979, *Biol. Cellulaire*, 35, 111—114.

Delain, E. *et* G. Rious, 1969, *C. R. Acad. SC. Paris*. 268 1327—1330.

Garnharm, P. C. C., 1971, *Bull. W. H. O.*, 44, 477—489.

Lewis, D. H., 1975, *J. Protozool.*, 22(3), 344—352.

Li Jing-yan and Wu Chuan-fen, 1985, *Endocytosis and Cell Research*, Vol. 2, No. 1,83—90.

Oakley, B. R., and J. Dodge, 1979, *Chromosoma* (Berl), 70, 277—291.

Tramezzani, J. H., O. R. Vidal, M. A. Cannata and S. R. Chiocchio, 1966, Acta Physiologica Americana, 16, 391—396.

THE ULTRASTRUCTURE OF *LEISHMANIA GERBILLI*

Wu Chuanfen and Li Jingyan

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

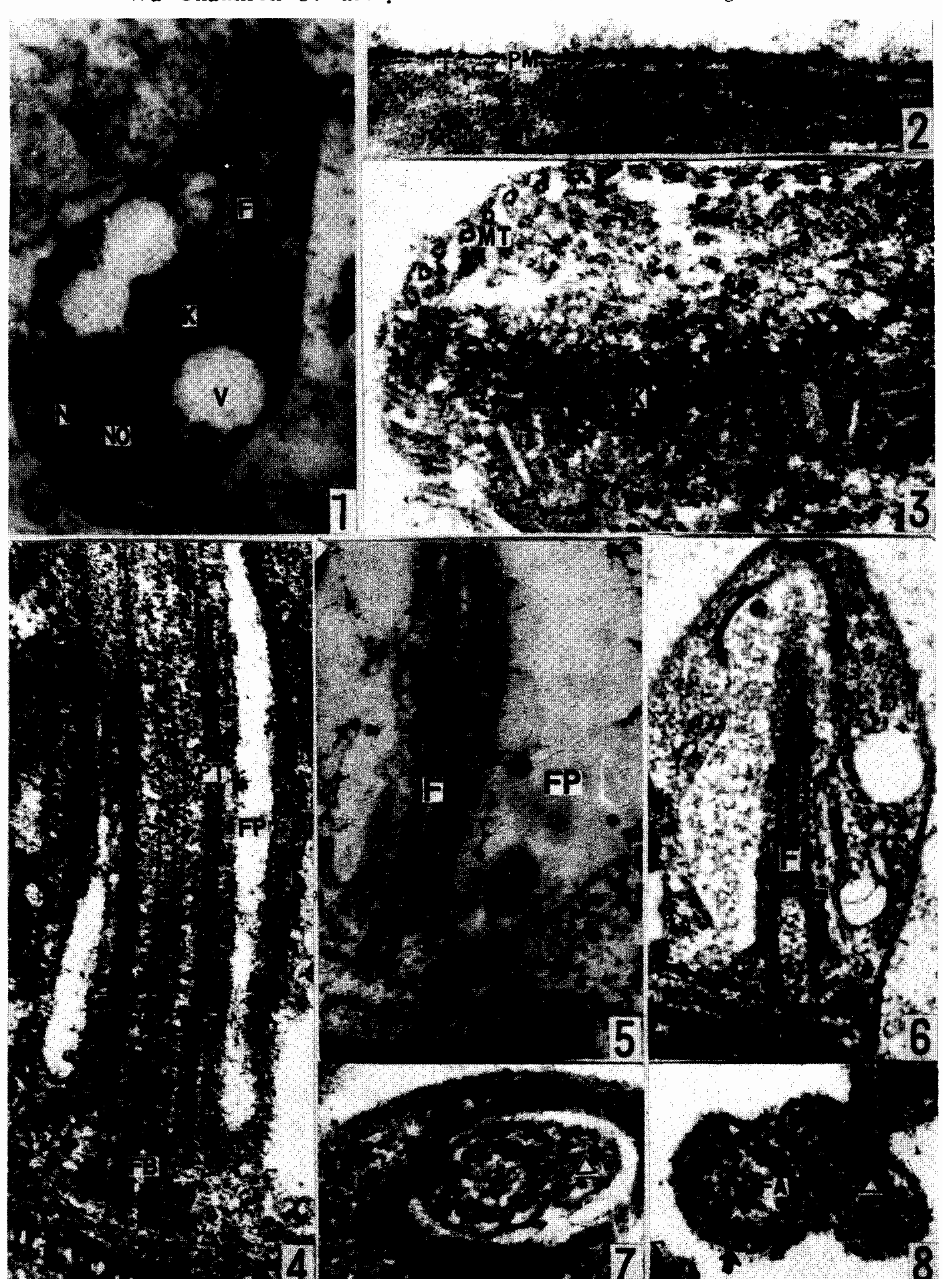
The fine structure of the culturing promastigote of *Leishmania gerbilli* was studied. This organism was isolated by Professor Wang Jie *et al*., from the rodent Rhombomys opimus livingin the northwestern part of China. The basic structure of it resembles that described for other trypanosomastids. However, the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus of the cells have not been found yet. Instead, one or two multilamellar structures posterior to the nucleus have been seen in some slender cells. These structures are concentric circles or ellipses consisted of a serial membranes. The function of them is unkown. Only one large crista-rich mitochondrion was observed. The mitochondrion, with branches going to both anterior and posterior parts of the organism, possesses a wide cavity in the midle part of the cell. The kinetoplast always lies in the mitochondrial cavity near the base of the flagellum. The subpellicular microtubules are arranged about 50nm apart. In addition, we found that the kinetoplast would become into a circular structure when cells were expanded.

Key words: *Kinetoplastida, Leishmania,* kinetoplast, ultrastructure

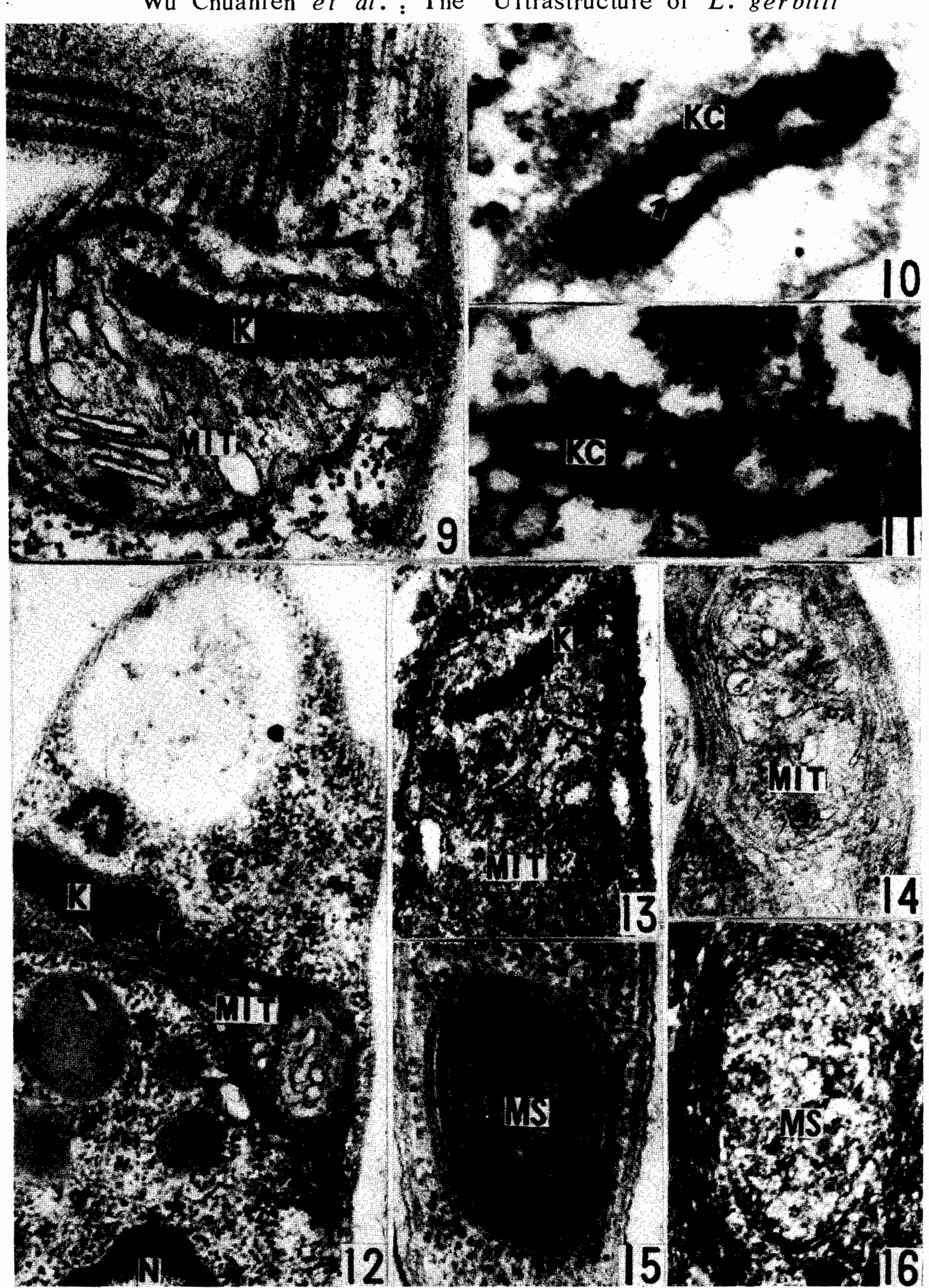
图版Ⅰ

吴传芬等：砂鼠利什曼原虫（*Leishmania gerbilli*）的亚显微结构

Wu Chuanfen *et al.*: The Ultrastructure of *L. gerbilli*



图版说明在正文内



图版说明在正文内